

REC'D 15 NOV 2000

PCT/JP00/06513

WIPO PCT

日 本 国 特 許 庁

22.09.00

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 7月13日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-212924

出 願 人

Applicant(s):

国際試薬株式会社

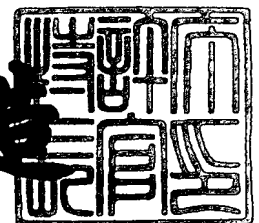
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087713

【書類名】 特許願
【整理番号】 NP00-1058
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 9/74
【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 奥田 昌宏

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2
国際試薬株式会社 研究開発センター内

【氏名】 菊川 紀弘

【特許出願人】

【識別番号】 000170565

【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088904

【弁理士】

【氏名又は名称】 庄司 隆

【電話番号】 03-3864-6572

【選任した代理人】

【識別番号】 100107939

【弁理士】

【氏名又は名称】 大島 由美子

【電話番号】 03-3864-6538

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第272092号

【出願日】 平成11年 9月27日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9815836

【包括委任状番号】 9901104

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トロンビンの安定化手段および組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含むことを特徴とするトロンビンの安定化手段。

【請求項2】 カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含むことを特徴とする請求項1に記載のトロンビンの安定化手段。

【請求項3】 少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含むことを特徴とする請求項2に記載のトロンビンの安定化手段。

【請求項4】 少なくとも請求項1～3のいずれか1項に記載のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物。

【請求項5】 測定再現性の確保のために、高分子多糖類および合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせ有効量を含むことを特徴とする請求項4に記載のトロンビン含有組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、トロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物に関する。さらに詳しくは、臨床検査の分野において用いられるトロンビン試薬の安定化手段および安定化されたトロンビンを含む試薬に関する。

【0002】

【従来の技術】

フィブリノゲンをフィブリンに変換する酵素であるトロンビンは血液凝固反応過程で非常に重要な役割をしている。臨床検査の分野においては、トロンビンを

用いてフィブリノゲン濃度を測定したり、トロンビン阻害物質の活性、例えば、アンチトロンビン III 活性、ヒルジンの活性、さらに化学合成阻害剤の活性を測定するために多く用いられている。

【 0 0 0 3 】

しかしながら、一般にトロンビンは不安定であるため、長期間保存する場合には通常凍結乾燥処理を施して保存していた。

【 0 0 0 4 】

トロンビンを安定化させる試みは現在まで数多く行われてきた。例えば、特開昭 5 6 - 3 9 7 8 2 号公報、特公平 3 - 7 6 2 9 2 号公報、特開平 1 - 9 3 5 3 6 号公報、特開平 2 - 5 3 7 3 2 号公報、特開昭 6 4 - 4 0 4 3 3 号公報、特開平 7 - 3 3 7 9 9 号公報、特開平 9 - 3 2 8 4 3 6 号公報、特公平 8 - 1 3 7 5 0 号公報、特開平 7 - 1 6 5 6 0 4 号公報、特公平 7 - 6 4 7 4 7 号公報、特開昭 6 3 - 1 9 2 7 2 3 号公報、特開平 4 - 3 2 0 6 8 3 号公報、特公昭 5 8 - 2 6 9 5 6 号公報、特開平 1 0 - 5 2 2 6 7 号公報、特開昭 6 0 - 1 1 1 2 7 2 1 号公報、特開昭 5 6 - 6 8 6 0 7 号公報にその例を見ることができる。

【 0 0 0 5 】

しかし、これらのいずれもトロンビンの安定化方法として完全なものではなく、とりわけ臨床検査診断薬に用いるには十分な安定性を示すには至っていない。

【 0 0 0 6 】

他方、測定試薬に用いられるトロンビンは、一般にヒトまたは動物由来のトロンビンを適当な緩衝液や安定化剤の含まれた溶液中に目標とする力価となるように加えて調製され、溶液または凍結乾燥品として保存、使用される。調製されたトロンビン試薬は、前述の如く様々な目的に用いられるが、いずれの場合にも、最終的にトロンビン自身の活性を測定することによりその目的を達成している。

【 0 0 0 7 】

トロンビンの活性の測定には、人工合成基質を用いた測定法と天然の基質であるフィブリノゲンを用いた測定法が一般的に用いられる。前者は比色分析が通常であり、後者は凝固時間分析が一般的である。後者の凝固時間分析法は、その検出手段として、散乱光や透過光の変化を検出することにより凝固時間を求める方

法や、凝固形成により球の移動ができなくなることを検出することにより凝固時間を求める物理的方法等が知られている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記の検出方法による凝固時間測定最大の課題は、測定の再現性が悪いことであった。トロンビンの活性測定法であるフィブリノゲンのフィブリンへの変換反応は液相反応から固相へ移行する反応であり、反応条件すなわちpHやイオン強度等により大きく変動することが知られている。これら反応条件の影響によって再現性が悪くなっていた。そこで、液状で安定なトロンビンを用いた、反応条件の影響を受けない、再現性の良い測定系の構築が待ち望まれていた。

本発明の目的は、トロンビンの安定化手段および安定化された測定再現性の良好なトロンビン含有組成物を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、トロンビンに、カルシウムイオンを、またはカルシウムイオンと水溶性の有機酸を混合して、含ませることにより、溶液状態、凍結乾燥品、または凍結乾燥処理した後再溶解させた溶液いずれにおいてもトロンビンの失活を防止できることを見出した。さらに、カルシウムイオン、水溶性有機酸以外にも、界面活性剤やタンパク質等がトロンビンに対する安定化効果を示すことを見出した。また、安定化効果を示す上記物質の他に、高分子多糖類または合成高分子類の1種または2種以上を混合して含有させることにより、測定再現性の良好なトロンビン試薬が調製できることを見出し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち本発明は、(1)カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含むことを特徴とするトロンビンの安定化手段、(2)カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物に加えて、水溶性有機酸

でトロンビン安定化機能を有する化合物を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする前記（１）のトロンビンの安定化手段、（３）少なくともカルシウムイオンおよび水溶性有機酸を併用し、トロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする前記（２）のトロンビンの安定化手段、（４）少なくとも前記（１）から（３）のいずれか１のトロンビンの安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物、および（５）測定再現性の確保のために、高分子多糖類および合成高分子類から選択された１種または２種以上を組み合わせる有効量を含有することを特徴とする前記（４）のトロンビン含有組成物、からなる。

【 0 0 1 1 】

【発明の実施の形態】

以下、本発明のトロンビン安定化手段および該安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物について、さらに詳しく説明する。本発明のトロンビンの安定化手段は、カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される１または２以上のトロンビン安定化機能を有する化合物のトロンビンについての安定化有効量を含有させることを特徴とする。また、これらの化合物に加えて、水溶性有機酸でトロンビン安定化機能を有する化合物をさらに併用するトロンビン安定化手段でありうる。ここで手段とは、目的を達成するために使用する方法および／または媒体を意味する

【 0 0 1 2 】

（トロンビン）

本発明のトロンビン安定化手段で安定化されるトロンビンは、動物由来、ヒト血漿由来、または遺伝子工学的手法で調製されたもののいずれでもよい。また、該安定化手段が導入されたトロンビン含有組成物の、溶液中のトロンビン濃度は、その活性が目的とする活性値に調整されていればよく、特に限定されない。

【 0 0 1 3 】

（カルシウムイオン）

トロンビンの安定化手段として用いるカルシウムイオンとしては、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、グルクロン酸カルシウム、酒石

酸カルシウム等の水溶性のカルシウム化合物が例示される。これらカルシウム化合物は1種または2種以上を組み合わせ選択し使用することができる。

【0014】

カルシウム化合物の使用量は、液状溶解時における終濃度が、5 mM～100 mMになるように添加されていることが好適で、より好ましくは15 mM～50 mMで用いる。

【0015】

(有機酸)

トロンビンの安定化手段として用いる有機酸は、水溶性のものが用いられ、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、蔞酸、マロン酸、コハク酸、グルコン酸、乳酸、グルクロン酸、グリコール酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、グルタル酸、アミノ酢酸、アミノカプロン酸等を例示することができる。これらの有機酸は、遊離酸またはその塩のどちらを用いても良い。また、1種もしくは2種以上を組み合わせ選択し使用することができる。

【0016】

有機酸の使用量は、液状溶解時における終濃度が、10 mM～500 mMになるように添加されていることが好適で、より好ましくは50 mM～200 mMで用いる。

【0017】

(界面活性剤)

トロンビンの安定化手段として用いる界面活性剤は、陰イオン性界面活性剤として、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシル-N-サルコシン酸ナトリウム、コール酸ナトリウム、デオキシコール酸ナトリウム、タウロデオキシコール酸ナトリウム等が、陽イオン性界面活性剤として、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルアンモニウムブロミド、ドデシルピリジニウムクロリド等が、両イオン性界面活性剤として、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸(CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CHAPSO)、パルミトイルリゾレシチン、ドデシル

ーN-ベタイン、ドデシル- β -アラニン等が、非イオン性界面活性剤として、オクチルグルコシド、ペプチルチオグルコシド、デカノイル-N-メチルグルカミド、ポリオキシエチレンドデシルエーテル、ポリオキシエチレンヘプタメチルヘキシルエーテル、ポリオキシエチレンイソオクチルフェニルエーテル（トライトンXシリーズ）、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビトールエステル（Tweenシリーズ）を例示することができる。

これら界面活性剤のうち非イオン性界面活性剤が特に好ましく用いられる。また、これら界面活性剤は1種もしくは2種類以上を組み合わせる選択しを用いることができる。

【0018】

界面活性剤の使用量は、液状溶解時における終濃度が1～0.001重量/容量%となるように添加されていることが好適で、より好ましくは0.1～0.005重量/容量%で用いる。

【0019】

（タンパク質）

トロンビンの安定化手段として用いるタンパク質としては、アルブミン、ゼラチン、グロブリンを例示することができるが、トロンビンに対する生理学的または生化学的機能をもたないものは一般的に使用できる。これらタンパク質は1種もしくは2種以上を組み合わせる選択しを用いることができる。

【0020】

タンパク質の使用量は、液状溶解時における終濃度が0.05～10重量/容量%となるように添加されていることが好適で、より好ましくは0.1～5重量/容量%で用いる。

【0021】

上記、トロンビンの安定化手段に用いるカルシウムイオン、水溶性有機酸、界面活性剤、およびタンパク質は、トロンビンの溶液状態での保存時、乾燥状態での保存時、および乾燥もしくは凍結乾燥品を溶解した時等の、トロンビンの酵素活性への影響を考慮して選択され用いられる。これらは、単独で使用しても安定

化効果があり、さらに2種以上を選択して使用することにより一層の安定化効果が期待できる。好ましくは2種以上を組み合わせ使用することであり、トロンビンの安定化効果はほぼ100%得られる。トロンビンの安定化機能を有する上記化合物を2種以上組み合わせ含有させる場合、上記各化合物の使用量の範囲内で各化合物を使用すればよい。また、これらの化合物を単独で使用する場合においても、2種以上組み合わせ使用する場合においても、トロンビンの液状製剤にあっては液状製剤中に上記の濃度で含有させ、乾燥製剤または凍結乾燥製剤にあっては最終的に液状になしたときの終濃度が上記の濃度になるように調整し含有させる。

【0022】

(測定再現性の向上のための添加物)

本発明は、上記本発明のトロンビンの安定化手段に加えて、トロンビン活性の測定再現性を向上させるために、高分子多糖類、および合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせその有効量を含有させてもよい。

高分子多糖類としては、デキストラン40、デキストラン70、デキストラン200、000、デキストラン500、000、フィコール等、合成高分子類としては、ポリビニルアルコール500、ポリビニルアルコール1500、ポリビニルアルコール2000、ポリエチレングリコール1500、ポリエチレングリコール2000、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール8000、ポリエチレングリコール20000およびポリビニルピロリドン等を挙げることができる。しかし、これらと同等物であって、トロンビン活性の測定再現性向上が達成される限りはこれらに限定されるものではない。また、これらの高分子物質は1種もしくは2種以上を組み合わせ選択し使用できる。

【0023】

高分子多糖類もしくは合成高分子類は、液状溶解時における終濃度が、1～10重量/容量%となるように添加されていることが好適で、より好ましくは1～3重量/容量%で用いられる。トロンビンの液状製剤にあっては液状製剤中に上

記の濃度で含有させ、乾燥製剤または凍結乾燥製剤にあっては最終的に液状になしたときの終濃度が上記の濃度になるように調整し含有させる。

【0024】

(トロンビン含有組成物)

本発明のトロンビン含有組成物は、トロンビンに、少なくともカルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選択される1または2以上のトロンビン安定化機能を有する化合物をトロンビンについての安定化有効量含有してなるか、これらに加えてトロンビン安定化機能を有する水溶性有機酸をその有効量含有してなる。また、これらのトロンビン安定化機能を有する化合物の他に、トロンビン活性の測定再現性を向上させるために、高分子多糖類、および合成高分子類から選択された1種または2種以上を組み合わせるその有効量を含有せしめてなる。トロンビン含有組成物は溶液状態において、通常緩衝液が使用される。その種類は、pH 4～9の範囲に緩衝能をもつ緩衝剤を適宜選択して用いる。例えば、HEPES、MOPS、BIS-TRIS、TRIS、MOPSO、ADA、MES等から1種もしくは2種以上が選択され用いられる。またトロンビン含有組成物には適当な防腐剤を添加してもよい。防腐剤としては、シプロフロキサシン、プロピオン酸もしくは安息香酸ナトリウム等の中から1種もしくは2種以上が選択して用いられる。また、必要に応じて食塩等の塩や、アミノ酸、糖等の一般的な安定化剤等を含ませることもある。

かくして得られるトロンビン含有組成物は、従来使用されているトロンビン試薬や組成物と比較して安定性が高く、トロンビン活性の測定再現性もよい。

【0025】

具体的には、5 mM～25 mMの緩衝液に、10 mM～20 mMのカルシウムイオン、例えば乳酸カルシウムを加え、50 mM～150 mMの有機酸、例えば酢酸を加え、さらに合成高分子類、例えばポリビニルアルコール500を2～3重量/容量%添加する。防腐剤を添加した後、溶液のpHを6～7付近に調整して母液を調製する。この母液に目的とする濃度または活性量のトロンビンを溶解し、トロンビン溶液を調製する。その溶液を適当な孔径のフィルターで濾過することもある。このようにして調製されたトロンビン溶液は、そのまま液状試薬と

してあるいは凍結乾燥処理して乾燥製剤試薬として製剤化され使用に提供される。上記具体例は、本発明のトロンビン含有組成物の一例を示すものであり、本発明はこの例に限定されるものではない。

【0026】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0027】

【実施例1】

20 mMのHEPES緩衝液 (pH 6.0) (無添加溶液)、同緩衝液に25 mMの乳酸カルシウムを加えた溶液 (Ca添加溶液)、同緩衝液に100 mMの酢酸を加えpH 6.0に調整した溶液 (酢酸添加溶液)、および酢酸添加溶液に25 mMの乳酸カルシウムを加えた溶液 (両方添加溶液) の4種類の溶液を調製し、それぞれにヒトトロンビンを100単位/mlとなるように添加しトロンビン溶液を調製した。調製したトロンビン溶液に防腐剤としてシプロフロキサシン0.1重量/容量%を加えて0.22 μ mのフィルターで除菌ろ過後、ガラス瓶に3mlずつ分注し、密栓後25℃で保存した。調製直後、1、2、3、4、5および6ヶ月後のトロンビンの残存活性を日本薬局方に従って測定し、トロンビンの安定化効果を調べた。その結果を表1に示した。

【0028】

【表1】 (トロンビンの残存活性: 25℃保存)

(単位: %)

	保 存 期 間						
	調製直後	1ヶ月	2ヶ月	3ヶ月	4ヶ月	5ヶ月	6ヶ月
無添加	100	89	84	57	35	17	8
Ca 添加	100	93	90	88	83	81	72
酢酸添加	100	97	93	89	85	82	74
両方添加	100	100	101	98	100	97	102

【0029】

この結果、少なくともカルシウムを添加することによりトロンビンが安定化され、25℃で6ヶ月保存した後も72%の残存活性が保持されていた。酢酸添加の効果は、特開昭56-39782に開示されている効果ではあるが、有機酸である酢酸の添加に加えてさらにカルシウムを添加することにより安定化効果がより高くなり、25℃で6ヶ月保存した後も全くトロンビン活性の低下は認められず、完全に安定化されることがわかった。

【0030】

【実施例2】

10mMのHEPES緩衝液(pH7.0)に150mMの食塩、0.1重量/容量%のアジ化ナトリウム、および20mM乳酸カルシウムを添加した溶液と、無添加の溶液を調製した。その溶液にポリビニルアルコール205(PVA205)、ポリビニルアルコール500(PVA500)、またはポリビニルアルコール1500(PVA1500)をそれぞれ無添加、0.1、0.5、1、2、3および5重量/容量%となるように添加した溶液を調製した。

【0031】

各溶液にトロンビンを100単位/mlとなるように溶解し、トロンビン溶液を調製した。調製した各トロンビン溶液を用いて、市販のコントロール血漿についてフィブリノゲン濃度の測定を行った。コントロール血漿をフィブリノゲン測定用緩衝液で10倍希釈したものを試料として、その100 μ lに上記調製したトロンビン溶液50 μ lを加え、37℃でその凝固するまでの時間を測定した。

【 0 0 3 2 】

上記一連の操作は、全自動凝固分析装置コアグレックス 7 0 0（島津製作所製）を用いて行った。同一試料を同時に 2 0 回測定して得られた凝固時間をもとにその変動係数を求め再現性の比較を行った。その結果を表 2 に示す。さらに、カルシウム無添加の溶液、すなわち上記の各溶液から 2 0 mM 乳酸カルシウムを除いた溶液を調製して同様の検討を行い、カルシウムイオンの再現性への効果を調べた。

【 0 0 3 3 】

【表 2】（ポリビニルアルコール添加トロンビン試薬の再現性）

（単位：C V %）

2 0 m M 乳酸カル シウム	PVA 種類	ポリビニルアルコール (PVA) 濃度						
		無添加	0.1%	0.5%	1%	2%	3%	5%
無添加	PVA205	20.1	17.8	18.6	15.5	14.3	14.3	16.5
	PVA500	22.3	15.0	17.8	15.3	14.1	14.8	16.7
	PVA1500	20.6	19.3	17.5	14.7	15.2	14.2	17.8
添加	PVA205	13.6	9.0	8.6	5.8	4.3	4.9	6.5
	PVA500	16.3	5.0	7.8	5.0	4.1	4.8	6.7
	PVA1500	15.6	9.0	7.5	3.7	6.5	7.1	7.8

【 0 0 3 4 】

この結果から、乳酸カルシウムを 2 0 mM 添加したトロンビン溶液では変動係数が乳酸カルシウム無添加のトロンビン溶液よりも小さくなり、再現性が向上することがわかった。さらにポリビニルアルコールを添加することにより再現性の向上がはかれることが判明し、1 ～ 3 重量／容量％でその効果は最大であった。実施例 1 の結果と実施例 2 の結果より、カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、再現性の向上に有効であることが判る。

【 0 0 3 5 】

【実施例 3】

ポリビニルアルコールに代えてデキストラン40 (Dex40)、デキストラン70 (Dex70)、デキストラン200, 000 (Dex200)を用い、その濃度を0.1、0.5、1、3、5、6、8および10重量/容量%とし、全てに20mM乳酸カルシウムを含ませた以外はすべて実施例2と同様に操作して、再現性の比較を行った。その結果を表3に示した。

【0036】

【表3】 (カルシウム無添加のデキストラン添加トロンビン試薬の再現性)

(単位: CV%)

Dex種類	デキストラン (Dex) 濃度								
	無添加	0.1%	0.5%	1%	3%	5%	6%	8%	10%
Dex40	13.6	21.0	12.8	9.9	4.8	3.4	3.4	3.7	4.3
Dex70	16.3	7.3	9.7	6.1	3.3	6.7	6.5	6.7	6.7
Dex200	15.6	20.1	14.2	8.8	4.6	5.8	5.5	6.3	7.0

【0037】

この結果から、高分子多糖類であるデキストラン類を添加することにより再現性の向上がはかれることが判明し、1～10重量/容量%の濃度でその効果は最大であった。

【0038】

【実施例4】

試料として20mMのHEPES緩衝液 (pH6.0) (無添加溶液)、同緩衝液に25mMの乳酸カルシウムを加えpH6.0に調整した溶液 (Ca添加溶液)、同緩衝液に100mMの酢酸を加えpH6.0に調整した溶液 (酢酸添加溶液)、同緩衝液に0.02重量/容量%のTween80を加えpH6.0に調整した溶液 (Tween80溶液)、同緩衝液に1.0重量/容量%のウシ血清アルブミンを加えpH6.0に調整した溶液 (1%BSA)、同緩衝液に2.0重量/容量%のウシ血清アルブミンを加えpH6.0に調整した溶液 (2%BSA)、同緩衝液に0.1重量/容量%の水溶性ゼラチンを加えpH6.0に調整した溶液 (水溶性ゼラチン)、および、上記酢酸添加溶液に25mMの乳酸カ

ルシウムを加え pH 6. 0 に調整した溶液（両方添加溶液）の 8 種類の溶液を調製し、それぞれにヒトロンビンを 100 単位／m l となるように添加し、トロンビン溶液を調製した。

【0039】

調製したトロンビン溶液に防腐剤としてシプロフロキサシン 0. 1 重量／容量 % を加え、0. 22 μ m のフィルターで除菌濾過後、ガラス瓶に 3 m l ずつ分注し、密栓後 25℃ で保存した。調製後、1、2、3、4、5 および 6 ヶ月後のトロンビンの残存活性を日本薬局方に従って測定し、トロンビンの安定化効果を調べた。表 4 に示したように、無添加溶液に比べ、いずれも有意の安定化効果を達成した。

【0040】

【表 4】（トロンビンの残存活性：25℃ 保存）

（単位 %）

	保 存 期 間						
	調製直後	1 ヶ月	2 ヶ月	3 ヶ月	4 ヶ月	5 ヶ月	6 ヶ月
無添加	100	89	79	57	35	17	8
Ca 添加	100	93	90	88	83	81	72
酢酸添加	100	97	93	89	85	82	74
Tween80 添加	100	94	92	87	84	81	78
1% BSA	100	95	91	89	83	80	75
2% BSA	100	90	86	83	78	74	72
0.1% 水溶性セラチン	100	91	85	83	78	75	73
両方添加	100	100	101	98	100	97	102

【0041】

【発明の効果】

以上説明したように、少なくともカルシウムの添加によりトロンビンが安定化され、さらに有機酸の補助添加により一層の安定化効果が得られた。その他、ト

ロンビンの安定化に、界面活性剤やタンパク質も有用であることを見出した。また、カルシウムイオンはトロンビンの安定化効果と共に、トロンビン活性の測定再現性の向上に有効であることも判明した。さらに高分子多糖類または合成高分子類が、トロンビン活性の測定再現性の向上有用であることを見出した。かくして本発明のトロンビンの安定化手段および該安定化手段を導入したトロンビン含有組成物は、従来にないトロンビンの安定化手段を提供するものであり、極めて有用な臨床検査用試薬組成物を提供するものである。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 トロンビンの安定化手段および安定化された測定再現性の良好なトロンビン含有組成物の提供。

【解決手段】 カルシウムイオン、界面活性剤、およびタンパク質から選ばれる1または2以上をその有効量含有させることを特徴とするトロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物、さらにこれらに加えて水溶性有機酸の有効量を併用するトロンビンの安定化手段および安定化されたトロンビン含有組成物を提供する。また、上記安定化されたトロンビン含有組成物に高分子多糖類もしくは合成高分子類の1種または2種以上を含有させた、トロンビンの安定性とトロンビン活性の測定再現性が極めて高いトロンビン含有組成物を提供する。

特 2 0 0 0 - 2 1 2 9 2 4

認 定 ・ 付 加 情 報

特許出願の番号	特願 2 0 0 0 - 2 1 2 9 2 4
受付番号	5 0 0 0 0 8 8 6 3 9 0
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 2 年 7 月 1 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成12年 7月13日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000170565]

1. 変更年月日 1990年 8月21日

[変更理由] 新規登録

住 所 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

氏 名 国際試薬株式会社